

ANA LIJOVIĆ

ISPITIVANJE UTJECAJA EKSTRAKCIJSKOG  
OTAPALA NA SADRŽAJ POLIFENOLA U  
EKSTRAKTIMA KORIJENA SLADIĆA

*(Glycyrrhiza glabra L.)*

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić.

*Veliko hvala upućujem svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Marijani Zovko Končić*

*na pruženoj pomoći, strpljenju te korisnim i stručnim savjetima.*

*Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za farmakognoziiju na susretljivosti te doktorandu*

*Petru na zajedničkoj suradnji tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.*

*Posebnu zahvalu upućujem svojoj obitelji i prijateljicama na razumijevanju, ljubavi i potpori  
tijekom cijelog mog studiranja.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. SLADIĆ .....	1
1.2. POLIFENOLI .....	4
1.3. UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIJA .....	7
1.4. METODE EKSTRAKCIJE .....	8
1.4.1. MACERACIJA .....	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	9
3. MATERIJALI I METODE .....	10
3.1. BILJNI MATERIJAL .....	10
3.2. KEMIJE .....	10
3.3. UREĐAJI .....	10
3.4. IZRADA EKSTRAKATA .....	10
3.4.1. IZRADA GLICEROLNIH I VODENIH MACERATA .....	10
3.4.2. IZRADA ETANOLNIH MACERATA .....	11
3.5. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA .....	11
3.5.1. POSTUPAK ODREĐIVANJA UKUPNIH POLIFENOLA .....	11
3.6. STATISTIČKA ANALIZA .....	11
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	12
4.1. IZRADA EKSTRAKATA .....	12
4.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA .....	13
4.3. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA .....	17
4.3.1. GLICEROLNI I VODENI MACERATI .....	17
4.3.2. ETANOLNI MACERATI .....	23
5. ZAKLJUČAK .....	29
6. LITERATURA .....	30
7. SAŽETAK/ SUMMARY .....	32
7.1. SAŽETAK .....	32
7.2. SUMMARY .....	32
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

### 1.1.SLADIĆ

*Glycyrrhiza glabra* L. (glatki sladić) biljna je vrsta iz porodice Fabaceae (mahunarke). Trajnica je visoka 1 - 1,5 m, s razgranatim podzemnim organima i perastim listovima s malim ovalnim liskama. Cvjetovi su leptirasti, ljubičaste boje i raspoređeni u rahle, grozdaste cvatove. Sladić raste u šikarama i među grmljem, uz putove i na suhim mjestima. Uspijeva na dubokom, pjeskovitom i propusnom tlu, na području vlažne i tople klime. Podrijetlom iz istočnog Mediterana, uzgojem se proširio po cijeloj Europi, od Španjolske preko južne Italije do Grčke. Raste i od Male Azije preko Sirije do Kine. U našim je krajevima zabilježen samo na nekim mjestima u Slavoniji i Dalmaciji (Kuštrak, 2005). Drogu (*Glycyrrhizae radix* – *Liquiritiae radix* – sladićev korijen) čini u jesen iskopano, oprano i osušeno korijenje i vriježe sladića. Korijenje i vriježe mogu biti oguljeni ili neoguljeni. Miris je slab, a okus sladak, kasnije nagorak i grebe u grlu (Kuštrak, 2005). Osim vrste *G. glabra*, za dobivanje droge mogu se koristiti i vrste *G. inflata* Bat. ili/i *G. uralensis* Fisch. (<http://www.ema.europa.eu>).



Slika 1. *Glycyrrhiza glabra* L., Fabaceae, sladić (<https://www.biolib.cz>)

Korijen je vretenast, pri vrhu nešto uži, različite dužine, debljine do 4 cm, naborane površine i vlaknasta prijeloma. Vriježe su ravne, valjkaste, različite dužine te široke do 2,5 cm. Sladićev korijen u prometu je izrezan u kockaste, sitne i tvrde komadiće, vlaknaste strukture. Svjetložute je boje, a na komadićima s periferije vidi se tamni sloj periderme (Kuštrak, 2005)



Slika 2. Korijen sladića (<https://www.pfaf.org>, <http://floranet.pagesperso-orange.fr>)

Kemijski sastav sladićeva korijena čine: triterpenski saponini (2 – 15%), flavonoidi (1 – 2%), kumarini (herniarin, umbeliferon), kiseli polisaharidi, steroli i mineralne tvari. Saponin glicirizin je najvažnija sastavnica sladićeva korijena. Sastoji se od kalijevih i kalcijevih soli glicirizinske kiseline, koju čine aglikon- gliciretin (sol gliciretinske kiseline) i dvije glukuronske kiseline. Ima i saponina s drugim aglikonima (glabranin A i B) (Kuštrak, 2005). Od flavonoida najvažniji su likviritin (aglikon - likviritigenin) i izolikviritin (aglikon - izolikviritigenin), od kojih potječe žuta boja korijena (Karami i sur.; 2013)

Sladićev korijen dobar je ekspektorans, spazmolitik (izolikviritigenin), laksativ (izrada laksativnih prašaka, kombinacija s laksativnim drogama) te virustatik (glicirizin). Kod ulkusa i gastritisa djeluje protuupalno. Smanjena je aktivnost pepsina i povećana viskoznost sluzi u želucu (Schafner i sur., 1999). Glicirizin i gliciretinska kiselina sprječavaju razgradnju kortikosteroida u jetri što dovodi do inhibicije lipooksigenaze. Sa sladićevim se korijenom izrađuju mnogi galenski ljekoviti oblici, ponajviše ekstrakti, koji se nalaze u monografijama europske farmakopeje. Također primjenjuje se i u kozmetici (za ublažavanje upale kože) te za izradu čajeva i slatkih pripravaka (Kuštrak, 2005)

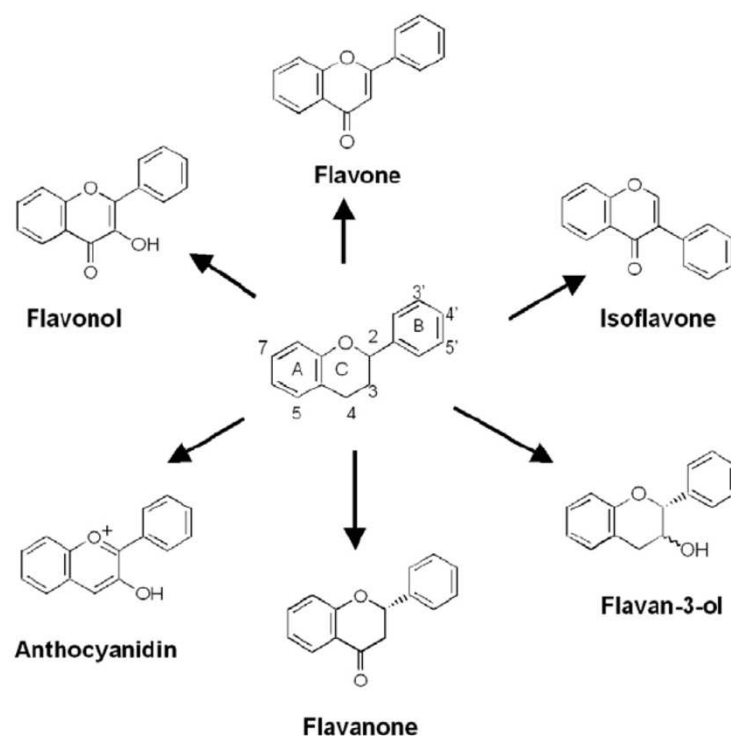
Nuspojave sladičeva korijena očituju se zadržavanjem vode, nateknutim licem i zglobovima, povišenim krvnim tlakom te glavoboljama i hipokalijemijom. Javljaju se samo kod pretjerane uporabe (visoke doze ili dugotrajno uzimanje). Maksimalno korištenje je 4 - 6 tjedana (Schafner i sur., 1999).

## 1.2.POLIFENOLI

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka u kojima imaju višestruku ulogu. Doprinosе senzorskim svojstvima, boji, aromi ili okusu biljke. Štite ju od mikroorganizama i štetnog UV zračenja te utječu na njezin rast i razmnožavanje (Kurtagić, 2017). Pokazuju širok raspon pozitivnog djelovanja na ljudsko zdravlje: antialergijsko, protuupalno, antimikrobno, antiarterosklerotsko, antitrombotsko, kardioprotektivno i vazodilatatorno djelovanje. Povezuju se s povoljnim učincima nastalim konzumacijom visokih doza voća i povrća (Balasundram i sur., 2006). Polifenoli su jedna od najvažnijih klasa prirodnih antioksidansa (Kurtagić, 2017). Imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala, doniranja vodikovih atoma i elektrona te keliranja metalnih kationa. Ovisno o vrsti polifenola pokazuju bolju ili lošiju antioksidativnu aktivnost jer ona ovisi o strukturi molekule (Balasundram i sur., 2006).

Polifenoli uključuju više tisuća spojeva različite kemijske strukture. Razlikujemo fenolne kiseline i derivate, lignane, kumarine, flavonoide, trjeslovine i antocijane. Svi polifenoli nastaju od biosintetskog prekursora šikiminske kiseline te kasnije zajedničkog intermedijera fenilalanina (Vladimir-Knežević, 2015). Po kemijskoj strukturi to su aromatski spojevi s više hidroksilnih supstituenata. Rijetko se nalaze u slobodnom obliku u prirodi, uglavnom su u konjugiranom ili esterificiranom obliku (Balasundram i sur., 2006).

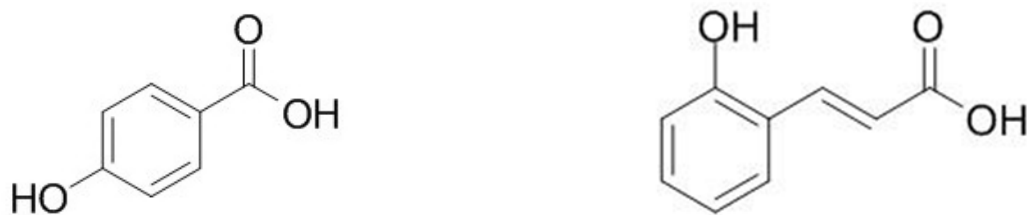
Flavonoidi čine najveću skupinu polifenola (Balasundram i sur., 2006). Po strukturi to su dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem ( $C_6-C_3-C_6$ ). Kod većine flavonoida središnji fragment povezan je s kisikom u heterociklični prsten. Raznolikost njihove strukture uvjetovana je stupnjem oksidacije heterocikličnog prstena te brojem i položajem hidroksilnih skupina na benzenskim jezgrama. Stoga se dijele na flavone, flavonole, flavanone, flavanonoli i dr. Uglavnom se nalaze u glikozidnom obliku. Obilježava ih vrsta, broj i položaj šećera vezanih na aglikon. Pretežno su O-glikozidi, a šećer je najčešće vezan u položaju 3 i 7 (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2015). Veliki broj istraživanja je potvrdio da flavonoidi imaju zaštitnu ulogu u zdravlja sisavaca posebno djelujući antikancerogeno i antiteratogeno (Kurtagić, 2017).



Slika 3. Podjela flavonoida prema strukturi (<https://www.researchgate.net>)

Fenolne kiseline dijele se na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Mogu biti u slobodnom obliku, u obliku estera ili glikozida. Osnovnu strukturu hidroksibenzojevih kiselina predstavlja  $C_6-C_1$  jedinica, a međusobne razlike proizlaze iz hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (npr. galna i vanilinska kiselina). U biljnim drogama zastupljenije su hidroksicimetne kiseline ( $C_6-C_3$ ) koje se također međusobno razlikuju prema hidroksilaciji i metilaciji aromatskog prstena. Među njima su najučestalije kavena i kumarinska kiselina. Uglavnom se nalaze u obliku estera (npr. klorogenska i ružmarinska kiselina), a rjeđe u slobodnom obliku (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2015). Hidroksicimetne kiseline, za razliku od hidroksibenzojevih kiselina, posjeduju veću antioksidativnu aktivnost. Pretpostavlja se da je razlog  $CH=CH-COOH$  skupina, koja osigurava bolje doniranje vodiovog elektrona i radikalnu stabilizaciju od  $COOH$  skupine hidroksibenzojeve kiseline (Balasundram i sur., 2006).





Slika 4. Hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina ([www.chemfaces.com](http://www.chemfaces.com))

### 1.3. UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIJA

UV-Vis spektrofotometrija je u farmakopejskim monografijama našla primjenu u identifikaciji, ispitivanju čistoće i određivanju sadržaja aktivnih i pomoćnih ljekovitih tvari. Primjena UV-Vis spektrofotometrije u kvalitativnoj analizi ljekovitih tvari temelji se na Lambert-Beerovom zakonu. Apsorbancija otopine (A) definirana je kao dekadski logaritam recipročne vrijednosti transmisije (T) monokromatskog svjetla:  $A = \log_{10}(1/T)$  ili  $A = \log_{10}(I_0/I)$

$I_0$  - intenzitet ulaznog monokromatskog svjetla

$I$  - intenzitet izlaznog monokromatskog svjetla

Izmjerena apsorbancija (A) proporcionalana je duljini puta svjetlosti kroz otopinu (b) i koncentraciji tvari u otopini (c):  $A = \epsilon \times c \times b$  ( $\epsilon$  – molarna apsorptivnost) (Watson, 1999).

U farmakopejskim monografijama koristi se izraz specifične apsorbancije otopljene tvari. Ona označava apsorbanciju otopine koncentracije 10 g/L, u kiveti debljine sloja 1 cm i mjerenu na propisanoj valnoj duljini, tako da vrijedi izraz:

$$A_{1cm}^{1\%} = \frac{10\epsilon}{M_r}.$$

Postoje tri uobičajene metode za izračunavanje sadržaja ljekovitih tvari: određivanje pomoću poredbene supstancije, određivanje pomoću specifične apsorbancije i određivanje pomoću baždarne krivulje (Nigović i sur., 2014).

## **1.4. METODE EKSTRAKCIJE**

### **1.4.1. MACERACIJA**

Maceracija je metoda iscrpljivanja aktivnih tvari iz biljnih droga. To je jednokratna ekstrakcija gdje se propisano usitnjena droga prelije ekstrakcijskim sredstvom te čuva u dobro zatvorenoj posudi, zaštićenoj od sunčeve svjetlosti onoliko dana koliko je propisano. Nakon toga se filtrira i dobiveni filtrat čini macerat. Maceracija je prikladna metoda ekstrakcije za slabo topljive, termolabilne tvari te tvari sklone bubrenju (Senjković, 2003).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Polifenoli kao sveprisutne molekule u prirodi i široko rasprostranjene u hrani biljnog porijekla pokazuju mnoge biološke učinke povoljne po ljudsko zdravlje. Najznačajnije je njihovo antioksidativno djelovanje. Brojne studije upućuju da veći unos voća i povrća u prehrani može smanjiti rizik od mnogih kroničnih bolesti upravo zahvaljujući sadržaju polifenola. U ovom radu ispitivan je sadržaj polifenola u 24 ekstrakta korijena biljne vrste *Glycyrrhiza glabra* L. Uspoređena je i učinkovitost maceracije s glicerolom i etanolom kao ekstrakcijskim otapalima.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1 BILJNI MATERIJAL**

Ispitivan je korijen biljne vrste *Glycyrrhiza glabra* L.

#### **3.2. KEMIČALIJE**

- Folin-Ciocalteu reagens
- Galna kiselina
- Natrijev karbonat dekahidrat
- Glicerol
- Etanol

#### **3.3. UREĐAJI**

U ispitivanju korišteni su sljedeći uređaji: precizna vaga (Mettler Toledo, Švicarska) i čitač mikrotitarskih pločica (Awareness Technology Stat Fax 3200, SAD).

#### **3.4. IZRADA EKSTRAKATA**

##### **3.4.1. IZRADA GLICEROLNIH I VODENIH MACERATA**

Izvagano je šesnaest puta po 0,1 g usitnjenog i osušenog korijena sladića i prenesno u šesnaest Erlenmayerovih tikvica sa ubrušenim čepom. Osam tikvica s drogom preliveno je sa 10 mL, a preostalih osam sa 30 mL različitog otapala (voda, 10%, 50% i 90% glicerol). Tikvice su nakon toga zatvorene stavljene na tamno mjesto na 24 i 72 h. Zatim je sadržaj tikvica filtriran kroz naborani filter papir. Uzorci su pohranjeni na 4 °C.

### **3.4.2. IZRADA ETANOLNIH MACERATA**

Izvagano je dva puta po 1,6 g i dva puta po 1,8 g usitnjenog i osušenog korijena sladića te preneseno u četiri Erlenmayerove tikvice. Dvije tikvice (1,6 i 1,8 g droge) prelivene su s 20 mL 50 % etanola, a ostale dvije (1,6 i 1,8 g droge) s 20 mL 100% etanola. Nakon toga tikvice su zatvorene parafilmom i stavljene na tamno mjesto 20 minuta i 72 h. Zatim je sadržaj tikvica filtriran kroz naborani filter papir. Uzorci su pohranjeni na 4 °C.

### **3.5. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA**

#### **3.5.1. POSTUPAK ODREĐIVANJA UKUPNIH POLIFENOLA**

U ekstraktima korijena sladića provedeno je određivanje polifenolnih spojeva prema modificiranom propisu prema Singletonu (1999.). Stavljeno je 80 µL ekstrakata korijena sladića u jažice mikrotitarske pločice. U ekstrakte je zatim dodano 80 µL Folin-Ciocalteu reagensa te 80 µL otopine natrijevog karbonata dekahidrata. Svi uzorci korišteni su u triplicatu. Za slijepu probu upotrebljeno je 160µL destilirane vode. Nakon sat vremena inkubacije na sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija na 630 nm. Količina ukupnih polifenola određena je pomoću baždarnog pravca galne kiseline (0.4 mg/mL).

### **3.6. STATISTIČKA ANALIZA**

Sva određivanja provedena su u triplicatu. Sadržaj polifenola uspoređivan je Studentovim *t*-testom. *P* vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. IZRADA EKSTRAKATA

Korištenjem navedenih ekstrakcijskih uvjeta priređeno je ukupno 24 ekstrakata. Uvjeti ekstrakcije glicerolom kao ekstrakcijskim otapalom i nazivi ekstrakata navedeni su u Tablici 1., a ekstrakcije etanolom kao ekstrakcijskim otapalom u Tablici 2.

Ekstrakcija većine polifenolnih spojeva najčešće se provodi upotrebom organskih otapala kao što su metanol, aceton, etanol i druga. Često se za ekstrakciju koriste i njihove kombinacije u različitim omjerima s vodom, a upravo pravilan odabir otapala utječe na iskorištenje ekstrakcije polifenola. U ovom radu od otapala korišteni su etanol, glicerol i voda. U brojnim istraživanjima etanol se već pokazao kao efikasno ekstrakcijsko otapalo dok glicerol nije toliko ispitivan. Stoga je u ovom istraživanju analiziran u različitim omjerima s vodom i uspoređivan s etanolom kao već poznatim otapalom.

Tablica 1. Uvjeti ekstrakcije glicerolom kao ekstrakcijskim otapalom i nazivi ekstrakata

Masa otapala (g)	Otapalo	Vrijeme	Naziv ekstrakta
10	10% Glicerol	24	M24-10g-10%G
10	50% Glicerol	24	M24-10g-50%G
10	90% Glicerol	24	M24-10g-90%G
10	H <sub>2</sub> O	24	M24-10g-H <sub>2</sub> O
30	10% Glicerol	24	M24-30g-10%G
30	50% Glicerol	24	M24-30g-50%G
30	90% Glicerol	24	M24-30g-90%G
30	H <sub>2</sub> O	24	M24-30g-H <sub>2</sub> O
10	10% Glicerol	72	M72-10g-10%G
10	50% Glicerol	72	M72-10g-50%G
10	90% Glicerol	72	M72-10g-90%G
10	H <sub>2</sub> O	72	M72-10g-H <sub>2</sub> O
30	10% Glicerol	72	M72-30g-10%G
30	50% Glicerol	72	M72-30g-50%G
30	90% Glicerol	72	M72-30g-90%G
30	H <sub>2</sub> O	72	M72-30g-H <sub>2</sub> O

Tablica 2. Uvjeti ekstrakcije etanolom kao ekstrakcijskim otapalom i nazivi ekstrakata

<b>Masa droge (g)</b>	<b>Otapalo</b>	<b>Vrijeme</b>	<b>Naziv ekstrakta</b>
1,6	50 % Etanol	20 minuta	M20m-1,6g-50%E
1,6	100 % Etanol	20 minuta	M20m-1,6g-100%E
1,8	50 % Etanol	20 minuta	M20m-1,8g-50%E
1,8	100 % Etanol	20 minuta	M20m-1,8g-100%E
1,6	50 % Etanol	72 h	M72-1,6g-50%E
1,6	100 % Etanol	72 h	M72-1,6g-100%E
1,8	50 % Etanol	72 h	M72-1,8g-50%E
1,8	100 % Etanol	72 h	M72-1,8g-100%E

#### 4.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima određen je na temelju vrijednosti apsorbancija otopina uzoraka pomoću baždarnog pravca galne kiseline. Rezultati su prikazani kao ekvivalenti galne kiseline (GE) u mililitrima ekstrakta (mg GE/ mL).

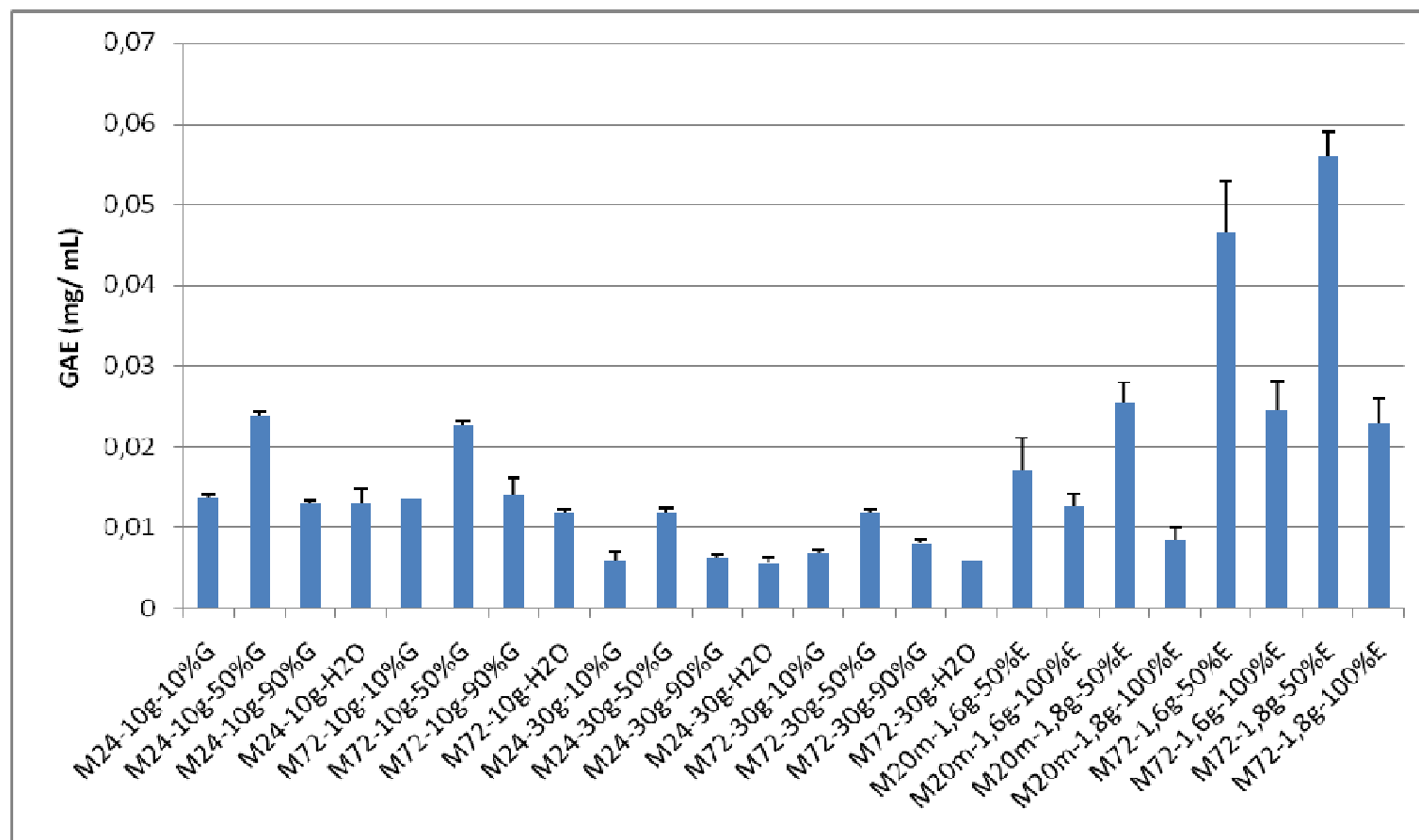


Tablica 3. Sadržaj ukupnih polifenola u glicerolnim i vodenim ekstraktima

<b>Naziv ekstrakta</b>	<b>GE(mg/ mL)</b>	<b>Standardna devijacija</b>
M24-10g-10%G	0,0137	0,0004
M24-10g-50%G	0,0135	0,0004
M24-10g-90%G	0,0131	0,0003
M24-10g-H <sub>2</sub> O	0,0238	0,0018
M24-30g-10%G	0,0226	0,0010
M24-30g-50%G	0,0141	0,0005
M24-30g-90%G	0,0068	0,0003
M24-30g-H <sub>2</sub> O	0,0130	0,0007
M72-10g-10%G	0,0060	0,0001
M72-10g-50%G	0,0119	0,0006
M72-10g-90%G	0,0119	0,0021
M72-10g-H <sub>2</sub> O	0,0056	0,0003
M72-30g-10%G	0,0107	0,0003
M72-30g-50%G	0,0081	0,0003
M72-30g-90%G	0,0064	0,0004
M72-30g-H <sub>2</sub> O	0,0061	0,0001

Tablica 4. Sadržaj ukupnih polifenola u etanolnim ekstraktima

<b>Naziv ekstrakta</b>	<b>GE(mg/ mL)</b>	<b>Standardna devijacija</b>
M20m-1,6g-50%E	0,0171	0,0039
M20m-1,6g-100%E	0,0125	0,0017
M20m-1,8g-50%E	0,0254	0,0025
M20m-1,8g-100%E	0,0085	0,0016
M72-1,6g-50%E	0,0466	0,0061
M72-1,6g-100%E	0,0254	0,0037
M72-1,8g-50%E	0,0560	0,0029
M72-1,8g-100%E	0,0277	0,0032

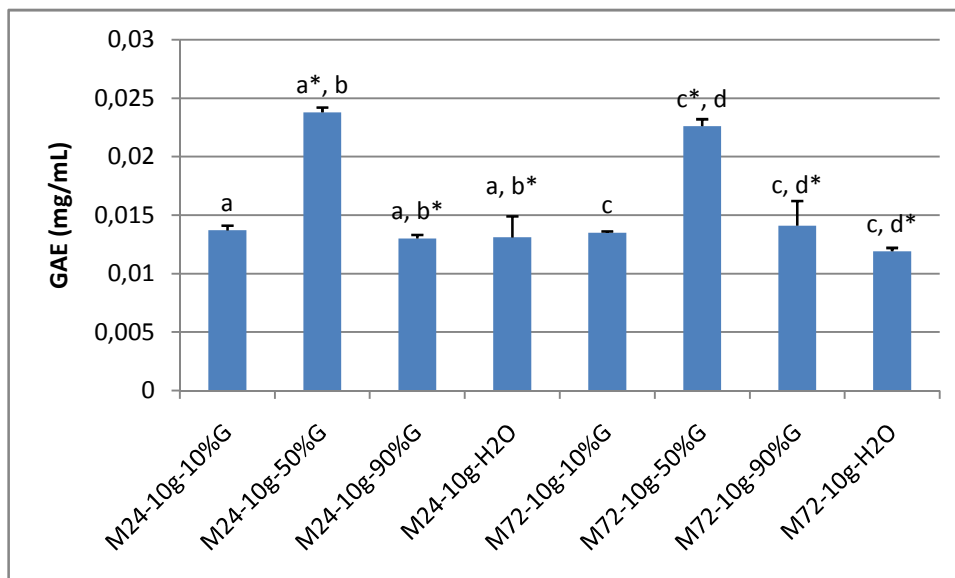


Slika 5. Usporedba sadržaja polifenola u svim ispitivanim maceratima.

Najveća koncentracija polifenola je pronađena kod 72-satnih macerata priređenih s 1,6 g i 1,8 g droge te 50% etanolom kao ekstrakcijskim otapalom. Kod glicerolnih macerata kao najpogodniji pokazao se onaj priređen s 50% glicerolom i masom otapala od 10 g. Iako rezultati nisu usporedivi jer je u glicerolnim maceratima korišteno 0,1 g droge dok je kod etanolnih korišteno 1,6 g i 1,8 g, zanimljivo je primijetiti da je 50%-tni glicerolni macerat bogatiji polifenolima od sljedećih etanolnih macerata: M20m-1,6g-100%E, M20m-1,8g-100%E i M20m-1,6g-50%E, te u rangu s M20m-1,8g-50%E, M72-1,6g-100%E i M72-1,8g-100%E ekstraktom. Detaljna usporedba dobivenih rezultata nije navedena ovdje nego je statistička analiza provedena u sljedećem poglavlju.

## 4.3 STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA

### 4.3.1 GLICEROLNI I VODENI MACERATI



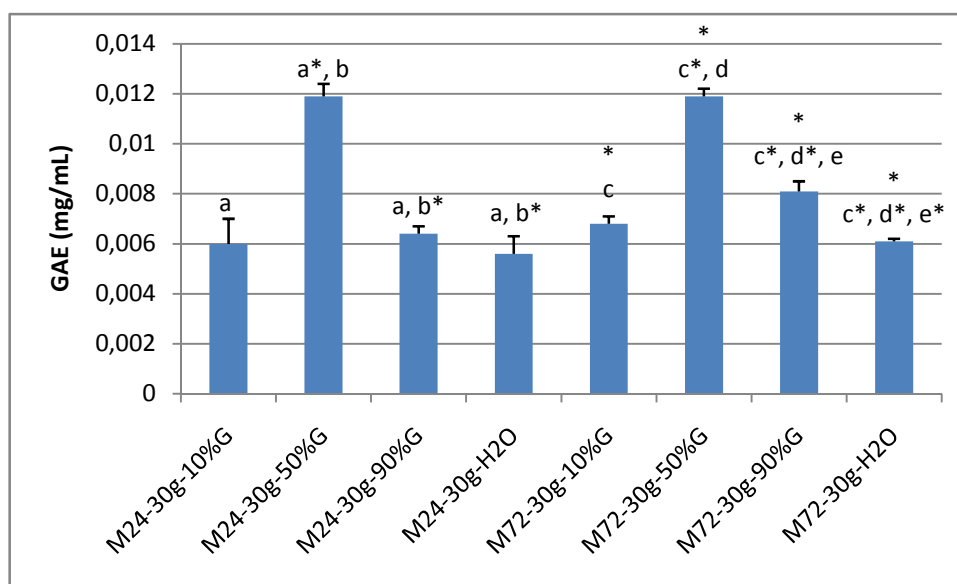
Slika 6. Usporedba sadržaja polifenola u 24- i 72-satnim maceratima priređenim od 0,1 g droge i 10 g otapala. Sve vrijednosti  $t$ -testa manje od 0,05 ( $P < 0,05$ ) ukazuju na statističku razliku i označene su zvjezdicom (\*) iznad 72- satnih macerata. Mala slova, prikazuju rezultate usporedbe s ekstraktima priređenim unutar istog ekstrakcijskog razdoblja. Ekstrakti povezani istim malim slovom su statistički jednaki dok zvjezdica pored slova ukazuje na statističku razliku.

Rezultati usporedbe sadržaja polifenola u 24-satnim i 72-satnim maceratima priređenim s 10 g otapala Studentovim  $t$ -testom prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Rezultati usporedbe sadržaja polifenola u 24-satnim i 72-satnim maceratima priređenim s 10 g otapala Studentovim  $t$ -testom

Uspoređeni ekstrakti	Vrijednost $t$ -testa ( $P$ )
M24-10g-10%G s M72-10g-10%G	0,5968
M24-10g-50%G s M72-10g-50%G	0,3521
M24-10g-90%G s M72-10g-90%G	0,0995
M24-10g-H <sub>2</sub> O s M72-10g-H <sub>2</sub> O	0,3812

Na slici je vidljiv utjecaj vremena maceracije na određenu količinu polifenola u maceratima priređenim s 0,1 g droge i 10 g otapala. Može se primijetiti da nema razlike u 72-satnim maceratima priređenim s 10%, 50% i 90% glicerolom te vodom kao otapalom, u odnosu na istovrsne 24-satne macerate. Može se pretpostaviti da se već nakon 24 h uspostavi ravnoteža između količine otopljenih i neotopljenih polifenola, odnosno da nastaje zasićena otopina, te da produljenje vremena ekstrakcije u ovom slučaju ne donosi dodatna poboljšanja. Iz Slike 6. je također vidljivo da je 50%-tni glicerol najbolje otapalo za polifenole prisutne u korijenu sladića, dok između ostalih otapala ne postoji značajna razlika.



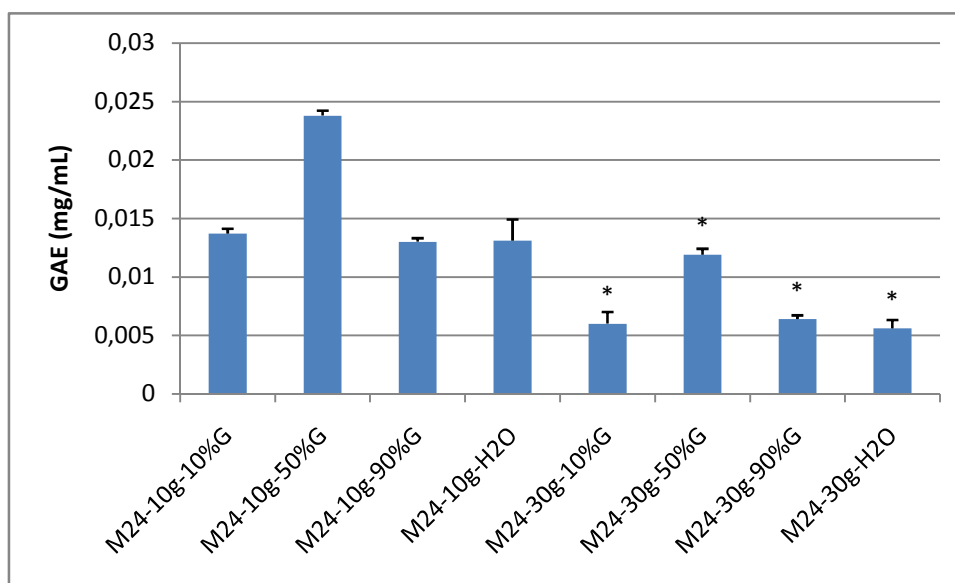
Slika 7. Usporedba sadržaja polifenola u 24- i 72-satnim maceratima priređenim od 0,1 g droge i 30 g otapala. Sve vrijednosti  $t$ -testa manje od 0,05 ( $P < 0,05$ ) ukazuju na statističku razliku i označene su zvjezdicom (\*) iznad 72-satnih macerata. Mala slova, prikazuju rezultate usporedbe s ekstraktima priređenim unutar istog ekstrakcijskog razdoblja. Ekstrakti povezani istim malim slovom su statistički jednaki dok zvjezdica pored slova ukazuje na statističku razliku.

Tablica 6. Rezultati usporedbe sadržaja polifenola u 24-satnim i 72-satnim maceratima priređenim s 30 g otapala Studentovim  $t$ -testom

Uspoređeni ekstrakti	Vrijednost $t$ -testa ( $P$ )
M24-30g-10%G s M72-30g-10%G	0,0173
M24-10g-50%G s M72-10g-50%G	0,0306
M24-10g-90%G s M72-10g-90%G	0,0034
M24-10g-H <sub>2</sub> O s M72-10g- H <sub>2</sub> O	0,0378

Za razliku od Slike 6, ova slika pokazuje malu razliku u sadržaju polifenola ovisno o vremenu trajanja ekstrakcije. Naime tu je korištena veća masa otapala nego u prethodnom slučaju, te još nije uspostavljena ravnoteža između količine otopljenih i neotopljenih polifenola. Kod macerata priređenih od sve četiri vrste otapala (10%, 50% i 90% glicerol te H<sub>2</sub>O) vidljiva je razlika. Veći sadržaj polifenola pokazuju 72-satni macerati jer duže vrijeme ekstrakcije omogućuje da se veći sadržaj polifenola ekstrahira. Također vidljivo je da je kod 24-satne ekstrakcije 50%-tni glicerol najbolje otapalo za polifenole prisutne u korijenu sladića, dok između ostalih otapala ne postoji značajna razlika. Međutim, kod 72-satne ekstrakcije vidljiva je i razlika između 90%-tnog glicerola i vode.

Utjecaj mase ekstrakcijskog otapala na sadržaj polifenola u navedenim maceratima je prikazan na Slikama 8. i 9.



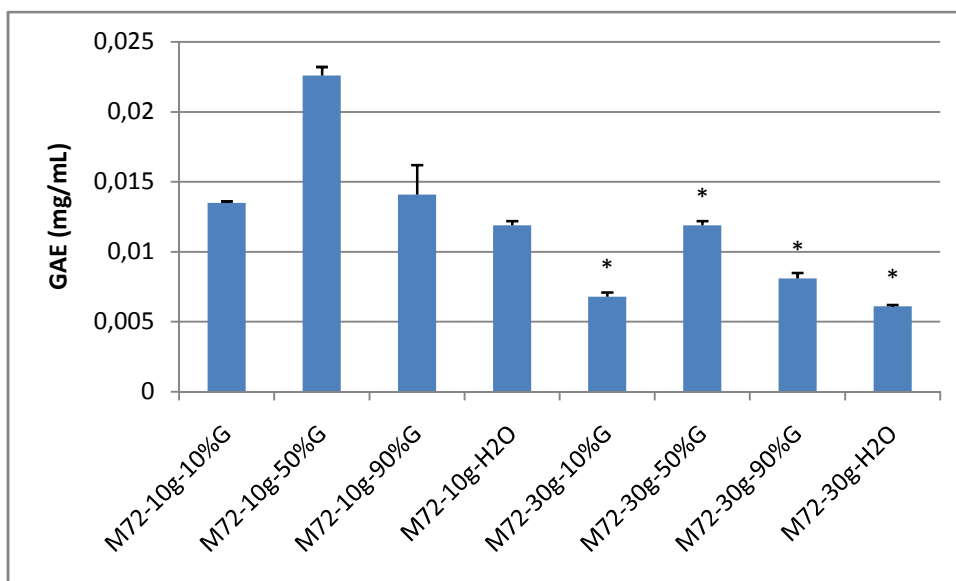
Slika 8. Usporedba sadržaja polifenola u 24-satnim maceratima priređenim od 0,1 g droge te 10 g i 30 g otapala. Sve vrijednosti *t*-testa manje od 0,05 ( $P < 0,05$ ) ukazuju na statističku razliku i označene su zvjezdicom (\*) iznad macerata priređenih od 30 g otapala.

Tablica 7. Rezultati usporedbe sadržaja polifenola u 24-satnim maceratima priređenim s 10 g i 30 g otapala Studentovim *t*-testom

Uspoređeni ekstrakti	Vrijednost <i>t</i> -testa ( <i>P</i> )
M24-10g-10%G s M24-30g-10%G	7,5437E-06
M24-10g-50%G s M24-30g-50%G	0,0002
M24-10g-90%G s M24-30g-90%G	0,0001
M24-10g-H <sub>2</sub> O s M24-30g- H <sub>2</sub> O	5,1844E-06

Manji sadržaj polifenola vidljiv je kod sve četiri vrste macerata priređenih s 30 g otapala u odnosu na istovrsne 24-satne macerate priređene s 10 g otapala. Zaključno, manja koncentracija polifenola nađena je kod veće mase otapala što je u skladu s formulom masene koncentracije, prema kojoj je masena koncentracija polifenola obrnuto proporcionalna volumenu otapala.





Slika 9. Usporedba sadržaja polifenola u 72-satnim maceratima priređenim od 0,1 g droge te 10 g i 30 g otapala. Sve vrijednosti *t*-testa manje od 0,05 ( $P < 0,05$ ) ukazuju na statističku razliku i označene su zvjezdicom (\*) iznad macerata priređenih od 30 g otapala.

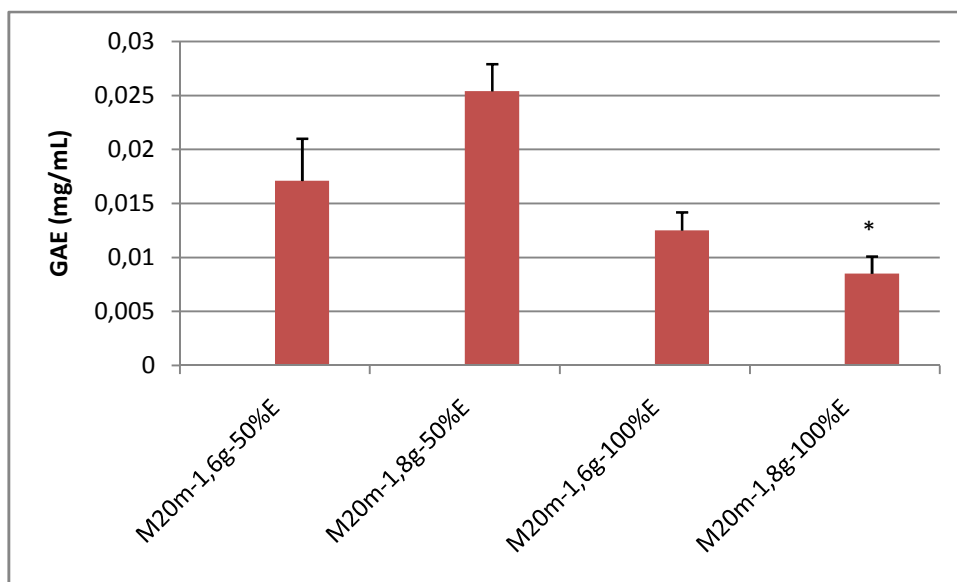
Tablica 8. Rezultati usporedbe sadržaja polifenola u 72-satnim maceratima priređenim s 10 g i 30 g otapala Studentovim *t*-testom

Uspoređeni ekstrakti	Vrijednost <i>t</i> -testa ( <i>P</i> )
M72-10g-10%G s M72-30g-10%G	2,2097E-05
M72-10g-50%G s M72-30g-50%G	8,5625E-05
M72-10g-90%G s M72-30g-90%G	6,60792E-05
M72-10g-H <sub>2</sub> O s M72-30g- H <sub>2</sub> O	0,0091

Utjecaj mase otapala na sadržaj polifenola potvrđen je i kod 72- satnih macerata. Sve četiri vrste macerata priređene s 30 g otapala pokazuju manji sadržaj polifenola u odnosu na istovrsne 72- satne macerate priređene s 10 g otapala.

### 4.3.2 ETANOLNI MACERATI

Utjecaj vrste otapala (50% i 100% etanol) na sadržaj polifenola prikazuju Slika 10. i 11.

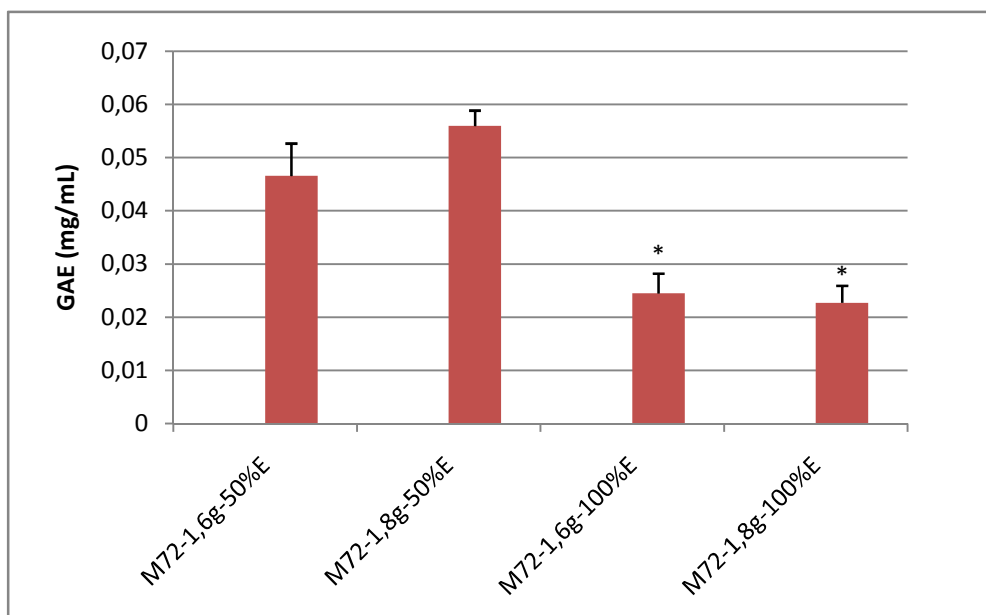


Slika 10. Usporedba sadržaja polifenola u 20-minutnim maceratima priređenim s 1,6 g i 1,8 g droge. Sve vrijednosti  $t$ -testa manje od 0,05 ( $P < 0,05$ ) ukazuju na statističku razliku i označene su zvjezdicom (\*) iznad macerata priređenih od 100%-tnog etanola.

Tablica 9. Rezultati usporedbe sadržaja polifenola u 20-minutnim maceratima priređenim s 1,6 g i 1,8 g droge Studentovim  $t$ -testom

Uspoređeni ekstrakti	Vrijednost $t$ -testa ( $P$ )
M20m-1,6g-50%E s M20m-1,6g-100%E	0,1393
M20m-1,8g-50%E s M20m-1,8g-100%E	0,0006

Vrsta otapala utječe na sadržaj polifenola samo kod macerata priređenih od 1,8 g droge. 50%-tni etanol pokazuje bolju ekstrakcijsku moć što je vidljivo u duplo većoj koncentraciji polifenola u odnosu na macerat sa 100% etanolom. Ovakvi, na prvi pogled nelogični rezultati, ukazuju na to da se unutar 20 minuta, koliko se ekstrakcija provodila, nije postigla ravnoteža između otopljenih i neotopljenih fenolnih sastavnica. To znači da je za uspostavljanje ravnoteže potrebno ili maceraciju provoditi dulje vrijeme ili se poslužiti nekom drugom vrstom ekstrakcije, poput primjerice ultrazvučne ekstrakcije.



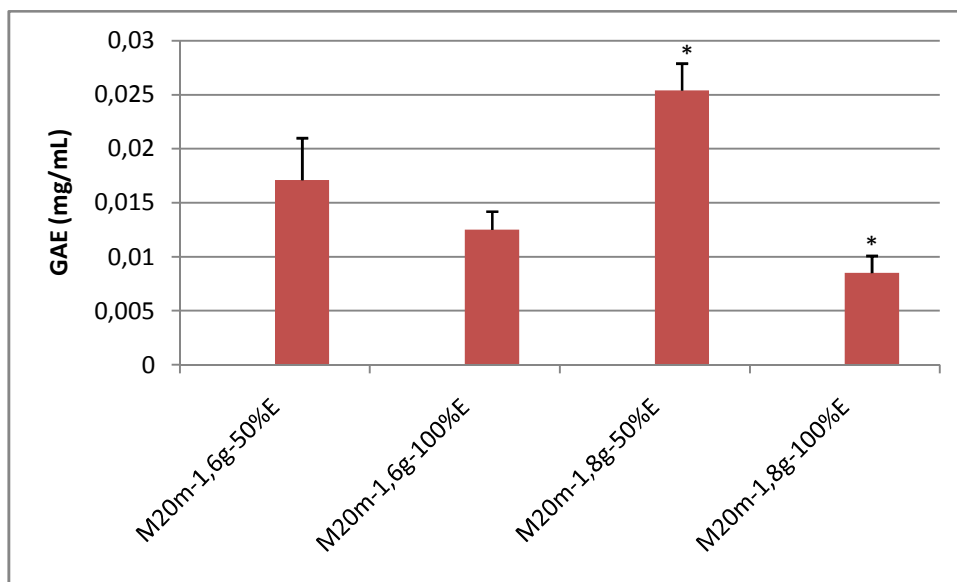
Slika 11. Usporedba sadržaja polifenola u 72-satnim maceratima priređenim s 1,6 g i 1,8 g droge. Sve vrijednosti  $t$ -testa manje od 0,05 ( $P < 0,05$ ) ukazuju na statističku razliku i označene su zvjezdicom (\*) iznad macerata priređenih od 100%-tnog etanola.

Tablica 10. Rezultati usporedbe sadržaja polifenola u 72-satnim maceratima priređenim s 1,6 g i 1,8 g droge Studentovim  $t$ -testom

Uspoređeni ekstrakti	Vrijednost $t$ -testa ( $P$ )
M72-1,6g-50%E s M72-1,6g-100%E	0,0060
M72-1,8g-50%E s M72-1,8g-100%E	0,0002

Za razliku od 20-minutnih macerata, tu je vidljiva razlika i kod macerata priređenih s 1,6 g i 1,8 g droge, koja približno odgovara porastu razlike mase. Time je potvrđena teza iz prethodnog poglavlja da se duljim vremenom maceracije postiže ravnoteža između otopljenih i neotopljenih fenolnih sastavnica. Također, vidljivo je da je 50%-tni etanol znatno bolje otapalo od 100%-tnog etanola.

Utjecaj mase droge na sadržaj polifenola u maceratima je prikazan na Slikama 12. i 13. Kod 20-minutne maceracije masa droge utječe na sadržaj polifenola u ekstraktima dok kod 72-satne maceracije razlike u sadržaju polifenola između, ekstrakta priređenih s 1,6 g i 1,8 g droge, nema.

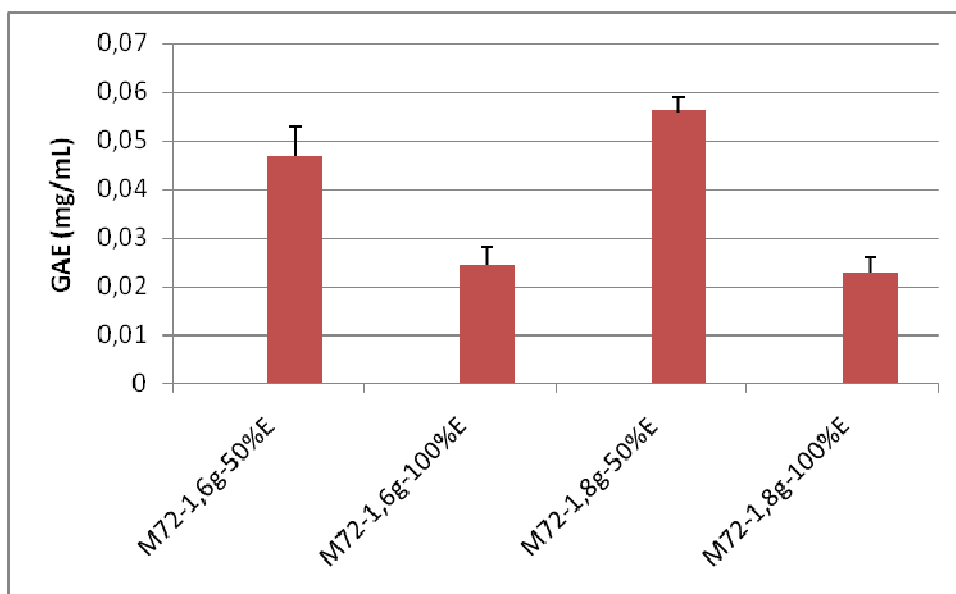


Slika 12. Usporedba sadržaja polifenola u 20-minutnim maceratima priređenim s 1,6 g i 1,8 g droge. Sve vrijednosti *t*-testa manje od 0,05 ( $P < 0,05$ ) ukazuju na statističku razliku i označene su zvjezdicom (\*) iznad macerata priređenih od 1,8 g droge.

Tablica 11. Rezultati usporedbe sadržaja polifenola u 20-minutnim maceratima priređenim s 1,6 g i 1,8 g droge Studentovim *t*-testom

Uspoređeni ekstrakti	Vrijednost <i>t</i> -testa ( <i>P</i> )
M20m-1,6g-50%E s M20m-1,8g-50%E	0,0358
M20m-1,6g-100%E s M20m-1,8g-100%E	0,0421

Macerat s 1,8 g droge, priređen s 50% etanolom pokazuje veći sadržaj polifenola u odnosu na istovrsni macerat priređen s 1,6 g droge. Međutim, porast količine ukupnih polifenola ne odgovara porastu mase droge, korištene u ekstrakciji. S druge strane, u otopini priređenoj s 100%-tnim etanolom, količina otopljenih polifenola čak i pada. Time se potvrđuje teza da 20 minuta nije dovoljno za uspostavljanje ekstrakcijske ravnoteže.



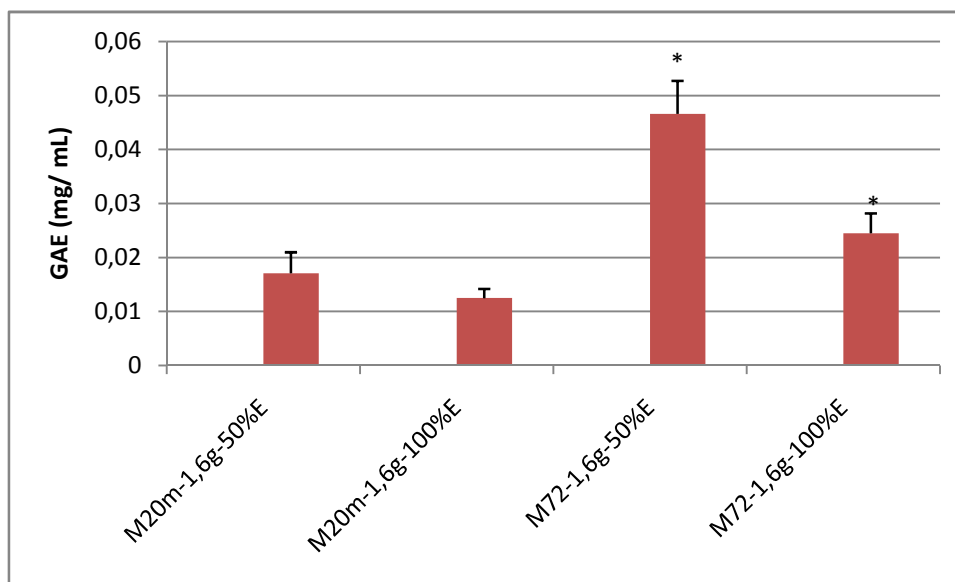
Slika 13. Usporedba sadržaja polifenola u 72-satnim maceratima priređenim s 1,6 g i 1,8 g droge. Sve vrijednosti  $t$ -testa manje od 0,05 ( $P < 0,05$ ) ukazuju na statističku razliku i označene su zvjezdicom (\*) iznad macerata priređenih od 1,8 g droge.

Tablica 12. Rezultati usporedbe sadržaja polifenola u 72-satnim maceratima priređenim s 1,8 g i 1,6 g droge Studentovim  $t$ -testom

Uspoređeni ekstrakti	Vrijednost $t$ -testa ( $P$ )
M72-1,6g-50%E s M72-1,8g-50%E	0,0744
M72-1,6g-100%E s M72-1,8g-100%E	0,5611

Masa droge ne utječe na sadržaj polifenola u navedenim ekstraktima. To može značiti ili da je već pri 1,6 g postignuta zasićena otopina ili da je razlika u otopljenoj tvari premala da bi je se moglo točno utvrditi primijenjenom spektroskopskom metodom.

Na slikama 14. i 15. uspoređeni su 20-minutni i 72-satni macerati te je ispitan utjecaj vremena maceracije na sadržaj polifenola u maceratima. Rezultati usporedbe sadržaja polifenola u 20-minutnim i 72-satnim maceratima priređenim s 1,6 g i 1,8 g droge Studentovim *t*-testom prikazani su u Tablici 13. i 14.

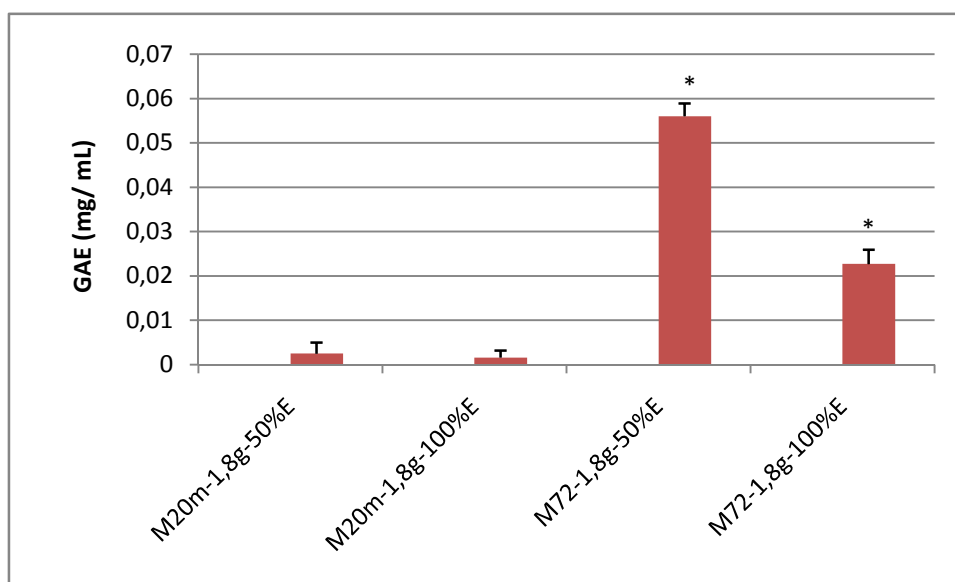


Slika 14. Usporedba sadržaja polifenola u 20- minutnim i 72- satnim maceratima priređenim s 1,6 g droge. Sve vrijednosti *t*-testa manje od 0,05 ( $P < 0,05$ ) ukazuju na statističku razliku i označene su zvjezdicom (\*) iznad 72-satnih macerata.

Tablica 13. Rezultati usporedbe sadržaja polifenola u 20-minutnim i 72-satnim maceratima priređenim s 1,6 g droge Studentovim *t*-testom

Uspoređeni ekstrakti	Vrijednost <i>t</i> -testa ( <i>P</i> )
M20m-1,6g-50%E s M72-1,6g-50%E	0,0022
M20m-1,6g-100%E s M72-1,6g-100%E	0,0071

Pokazalo se da dulje vrijeme maceracije pokazuje značajno veću koncentraciju polifenola u ispitivanim maceratima jer dulji period ekstrakcije omogućuje da se više polifenola ekstrahira. Ovim je dokazana teza iz prethodnih poglavlja da 20 min nije dovoljno vrijeme za uspostavljanje ekstrakcijske ravnoteže.



Slika 15. Usporedba sadržaja polifenola u 20- minutnim i 72- satnim maceratima priređenim s 1,8 g droge. Sve vrijednosti  $t$ -testa manje od 0,05 ( $P < 0,05$ ) ukazuju na statističku razliku i označene su zvjezdicom (\*) iznad 72-satnih macerata.

Tablica 14. Rezultati usporedbe sadržaja polifenola u 20-minutnim i 72-satnim maceratima priređenim s 1,8 g droge Studentovim  $t$ -testom

Uspoređeni ekstrakti	Vrijednost $t$ -testa ( $P$ )
M20m-1,8g-50%E s M72-1,8g-50%E	0,0002
M20m-1,8g-100%E s M72-1,8g-100%E	0,0025

Kao i na prethodnoj slici i ovdje se potvrđuje teza da 20 min nije dovoljno vrijeme za uspostavljanje ekstrakcijske ravnoteže.

## 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ekstrakcijskog otapala na sadržaj polifenola u ekstraktima korijena sladića (*Glycyrrhiza glabra* L.). Uspoređivani su glicerolni (10%, 50% i 90%), vodeni i etanolni ekstrakti (50% i 100%) te je donesen sljedeći zaključak. Kod glicerolnih macerata, priređenih od 10 g otapala, već nakon 24 h nastaje zasićena otopina te produljenje vremena ekstrakcije ne pridonosi poboljšanju ekstrakcije, dok kod macerata ,priređenih od 30 g otapala, produljenje vremena ekstrakcije pridonosi većem sadržaju polifenola. Također, vidljivo je da je 50%-tni glicerol bolje otapalo od vode te 10%-tnog i 90%-tnog glicerola. Nadalje, u skladu s formulom masene koncentracije manja masa otapala daje veći sadržaj polifenola u ispitivanim glicerolnim maceratima. Kod etanolnih pak macerata utvrđeno je da 20 minuta nije dovoljno za uspostavljanje ekstrakcijske ravnoteže te da je 50%-tni etanol bolje otapalo od 100%-tnog etanola. Na kraju, zbog korištenja različite mase droge kod glicerolnih i etanolnih macerata, rezultate nije moguće točno međusobno usporediti te ostaje otvoreno pitanje koliko je zapravo glicerol bolji ili lošiji kao otapalo od etanola.



## 6. LITERATURA

Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99, 2006, 191 - 203.

Flavonoidi 2018., <https://www.researchgate.net/>, pristupljeno 13.6.2018.

Glycyrrhiza glabra - L. 2005., <http://floronet.pagesperso-orange.fr>, pristupljeno 13.6.2018.

Glycyrrhiza glabra - L., 2018., <https://www.pfaf.org>, pristupljeno 13.6.2018.

Hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina 2018., [www.chemfaces.com](http://www.chemfaces.com), pristupljeno 13.6.2018.

Liquiritiae radix, 2018., <http://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 30.07.2018.

Liquorice, Glycyrrhiza glabra L., 2013., <https://www.biolib.cz>, pristupljeno 13.6.2018.

Kurtagić H., Polifenoli i flavonoidi u medu, *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, 2017, 6 (1), 28 – 35.

Karami, Z., Mirzaei, H., Emam-Djomeh, Z., Sadeghi Mahoonak, A.R. and Khomeiri, M., Effect of harvest time on antioxidant activity of *Glycyrrhiza glabra* root extract and evaluation of its antibacterial activity, *IFRJ*, 2013. 20(5): 2951-2957.

Kuštrak D. Farmakognozija-fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2005, 495 – 497.

Nigović B. i sur. Analitika lijekova-praktikum. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, 36.

Senjković R, Osnove oblikovanja lijekova, Zagreb, Školska knjiga, 2003, 42 – 45.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B. Praktikum iz Farmakognozije 1. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2015, 18, 20.

Watson D, Pharmaceutical analysis, Glasgow, Chirchill livingstone, 1999, 79.

Willi Schafner, Barbara Hafelfinger, Beat Ernst, Ljekovito bilje kompendij, Rijeka, Leo commerce, 1999, 126 – 127.

## **7. SAŽETAK/ SUMMARY**

### **7.1 SAŽETAK**

Polifenoli su prirodni antioksidansi koji pokazuju brojne povoljne učinke na ljudsko zdravlje. U ovom radu provedeno je spektrofotometrijsko određivanje polifenola u ekstraktima korijena sladića (*Glycyrrhiza glabra* L). Ispitivan je utjecaj ekstrakcijskog otapala na sadržaj polifenola u 24 ekstrakta. Uspoređivani su glicerolni, vodeni i etanolni ekstrakti. Osim vrste otapala analiziran je i utjecaj mase droge, mase otapala te vrijeme provođenja ekstrakcije na sadržaj polifenola u navedenim ekstraktima. Utvrđeno je da je 50%-tni glicerol bolje otapalo od vode te 10%-tnog i 90%-tnog glicerola. Kod ekstrakcije etanolom pokazano je da 20 minuta nije dovoljno za ekstrakciju i da je 50%-tni etanol bolje otapalo od 100%-tnog etanola.

### **7.2. SUMMARY**

Polyphenols are natural antioxidants which have many beneficial effects on human health. In this study, spectrophotometric determination of polyphenols was carried out in extracts made from liquorice root (*Glycyrrhiza glabra* L). The effect of extraction solvent on the content of polyphenols in 24 extracts was investigated. Glycerol, water and ethanol extracts were compared. In addition to the type of solvent, the influence of the drug mass, the solvent mass and the time of extraction on the polyphenol content in these extracts were also studied. It was found that 50% glycerol is better solvent than water and 10% and 90% glycerol. With ethanol extraction it is shown that 20 minutes is not enough for extraction and 50% ethanol is better solvent than 100% ethanol.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmakognoziju  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### ISPITIVANJE UTJECAJA EKSTRAKCIJSKOG OTAPALA NA SADRŽAJ POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA KORIJENA SLADIĆA (*Glycyrrhiza glabra* L.)

Ana Lijović

#### SAŽETAK

Polifenoli su prirodni antioksidansi koji pokazuju brojne povoljne učinke na ljudsko zdravlje. U ovom radu provedeno je spektrofotometrijsko određivanje polifenola u ekstraktima korijena sladića (*Glycyrrhiza glabra* L.). Ispitivan je utjecaj ekstrakcijskog otapala na sadržaj polifenola u 24 ekstrakta. Uspoređivani su glicerolni, vodeni i etanolni ekstrakti. Osim vrste otapala analiziran je i utjecaj mase droge, mase otapala te vrijeme provođenja ekstrakcije na sadržaj polifenola u navedenim ekstraktima. Utvrđeno je da je 50%-tni glicerol bolje otapalo od vode te 10%-tnog i 90%-tnog glicerola. Kod ekstrakcije etanolom pokazano je da 20 minuta nije dovoljno za ekstrakciju i da je 50%-tni etanol bolje otapalo od 100%-tnog etanola.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 32 stranice, 15 grafičkih prikaza, 14 tablica i 15 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: polifenoli, maceracija, spektrofotometrija, glicerol, etanol

Mentor: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Marija Kindl**, poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: rujan 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacognosy  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### EXAMINATION OF EXTRACTION SOLVENT INFLUENCE ON POLYPHENOLS CONTENT IN EXTRACTS OF LIQUORICE ROOT (*Glycyrrhiza glabra* L.)

Ana Lijović

#### SUMMARY

Polyphenols are natural antioxidants which have many beneficial effects on human health. In this study, spectrophotometric determination of polyphenols was carried out in extracts made from liquorice root (*Glycyrrhiza glabra* L.). The effect of extraction solvent on the content of polyphenols in 24 extracts was investigated. Glycerol, water and ethanol extracts were compared. In addition to the type of solvent, the influence of the drug mass, the solvent mass and the time of extraction on the polyphenol content in these extracts were also studied. It was found that 50% glycerol is better solvent than water and 10% and 90% glycerol. With ethanol extraction it is shown that 20 minutes is not enough for extraction and 50% ethanol is better solvent than 100% ethanol.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 32 pages, 15 figures, 14 tables and 15 references. Original is in Croatian language.

Keywords: polyphenols, maceration, spectrophotometry, glycerol, ethanol

Mentor: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Marija Kindl, Ph.D.** Postdoctoral researcher, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2018.